

Antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma bovis* strains isolated from cattle in Hungary, Central Europe

(extended secondary publication)

Sulyok Kinga Mária¹, Kreizinger Zsuzsa¹, Fekete Lilla¹, Hrivnák Veronika¹, Magyar Tibor¹, Jánosi Szilárd², Schweitzer Nóra², Turcsányi Ibolya², Makrai László³, Erdélyi Károly², Gyuranecz Miklós^{1*}

K. M. Sulyok¹, Zs. Kreizinger¹, L. Fekete¹, V. Hrivnák¹, T. Magyar¹, Sz. Jánosi², N. Schweitzer², I. Turcsányi², L. Makrai³, K. Erdélyi², M. Gyuranecz^{1*}

1. MTA Agrártudományi Kutatóközpont Állatorvos-tudományi Intézet, 1143 Budapest, Hungária krt. 21.

* e-mail: m.gyuranecz@gmail.com

2. NÉBIH Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság H-1149 Budapest, Tábornok u. 2.

3. Állatorvostudományi Egyetem Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék H-1143 Budapest, Hungária krt. 23-25.

BAKTERIOLÓGIA

Hazai *Mycoplasma bovis* törzsek antibiotikum-érzékenységének vizsgálata

(bővített másodközlés)

ÖSSZEFOGLALÁS

A *Mycoplasma bovis* világszerte elterjedt kórokozó, szarvasmarhákban tüdő-, tőgy- és ízületgyulladást idézhet elő. A *M. bovis* okozta légzőszervi megbetegedések és az eredményeként kialakult gazdasági károk mérséklése antibiotikum-terápia alkalmazásával lehetséges. A szerzők 35, Magyarország különböző területeiről származó *M. bovis* izolátum minimális gátló koncentráció- (MIC-) értékét határozták meg mikroleves-hígításos módszerrel, 15 antibiotikummal szemben. A pleuromutilinek kivételével az összes antibiotikummal szemben találtak magas MIC-értékkel rendelkező hazai *M. bovis* törzset. A terápia során gyakran alkalmazott antibiotikumokkal – elsősorban a tetraciklinekkel és makrolidokkal – szemben emelkedett MIC-értékeket tapasztaltak. Számos vizsgált *M. bovis* törzs növekedését nem gátolta a gentamicin, a spektinomycin, a florfenicol vagy a linkomicin sem.

Eredményeik felhívják a figyelmet a rendszeres antibiotikum-érzékenységi vizsgálatok szükségességére. *In vitro* vizsgálataik alapján a fluorokinolonok és a szarvasmarhákra nem törzskönyvezett pleuromutilinek bizonyultak a leghatékonyabb antibakteriális szernek a hazai *M. bovis* törzsek ellen. Az antibiotikum-rezisztencia további terjedésének megakadályozása érdekében azonban a jelenlegi rendelkezések a fluorokinolonok alkalmazását csak súlyos, más antibiotikumra nem reagáló eseteknél ajánlják.

SUMMARY

Background and Objectives: *Mycoplasma bovis* is a worldwide pathogen, causative agent of pneumonia, mastitis, arthritis, and a variety of other symptoms in cattle. The economic losses due to mycoplasma pneumonia could be reduced by antibiotic treatment.

Materials and Methods: Minimal inhibitory concentration (MIC) values of 35 *M. bovis* strains collected from different parts of Hungary were determined by the microbroth dilution method to fifteen antibiotics.

Results and Discussion: Strains with high MIC values were found in the case of all applied antibiotics with the exception of pleuromutilins. Our results confirm the observations of increasing MIC values to antibiotics commonly used in the therapy of *Mycoplasma* infections, primarily to tetracyclines and macrolides. The growth of many *M. bovis* strains was not inhibited by gentamicin, spectinomycin, florfenicol or lincomycin. Our results emphasize the necessity of systematic testing for antibiotic susceptibility of *M. bovis* in this geographic region. The most effective antibiotics tested *in vitro* were fluoroquinolones and pleuromutilins (not registered for cattle) for *M. bovis* strains in Hungary. However, current antimicrobial usage policies have to be taken into account to avoid further antibiotic resistance development and to reserve fluoroquinolones for the treatment of severe infections which have responded poorly to other classes of antimicrobials.

A *M. bovis* széles körben elterjedt kórokozó, amelyet elsőként 1961-ben az Amerikai Egyesült Államokban izoláltak egy súlyos tőgygyulladásban szenvedő szarvasmarhából (12). Szarvasmarhákban elsősorban tüdő-, tőgy-, ízület- és középfülgyulladást, valamint ritkán szaporodásbiológiai zavarokat okoz (19). A *M. bovis* felelős a szarvasmarha légzőszervi megbetegedések okozta gazdasági veszteségek 25–33%-áért (20).

A M. bovis szarvasmarhákban elsősorban tüdő-, tőgy-, ízület- és középfülgyulladást, valamint szaporodásbiológiai zavarokat okoz

Nem áll rendelkezésre hatékony vakcina, ezért a megfelelő tartási körülmények és az antibiotikum-terápia a védekezés legfőbb eszközei

35 magyarországi izolátum antibiotikum-érzékenységi profilját határozták meg

Magyarországon a szarvasmarhák átlagos szeropozitivitása 11,3%, de bizonyos állományokban elérheti az 50%-ot is. ELISA- (enzyme-linked immunosorbent assay) vizsgálatok alapján az állományok 64,7%-a mutatott szeropozitivitást (26), ami nagyobb más európai országokban tapasztalt értékeknél (20, 21).

Nem áll rendelkezésre hatékony vakcina a *M. bovis* okozta fertőzések megelőzésére, ezért a megfelelő tartási körülmények és az antibiotikum-terápia a védekezés legfőbb eszközei. A *M. bovis* eredetű tőgygyulladások antibiotikummal való kezelése sokszor végződik eredménytelenül. A kórokozó által okozott tüdőgyulladás viszont jól reagál az antibiotikum-terápiára, ezáltal nagymértékben csökkenthetőek a baktérium által okozott gazdasági károk (20, 22). Mivel a *Mycoplasma*-fajok nem rendelkeznek sejtfallal és folsavat sem termelnek, így eredendően rezisztensek a β -laktám antibiotikumokra és szulfonamidokra. A fehérje- (tetraciklinek, makrolidok, linkozamidok, fenikolok, pleuromutilinek) és nukleinsav-szintézist gátló (fluorokinolonok) antibiotikumok viszont hatékonyak lehetnek a különböző *Mycoplasma*-fajokkal szemben (19). A *Mycoplasma*-fertőzések kezelésére hagyományosan használt antimikrobiális szerek (spektinomycin, oxitettraciklin és tilmikozin) hatékonysága Európában csökkenő tendenciát mutat (18).

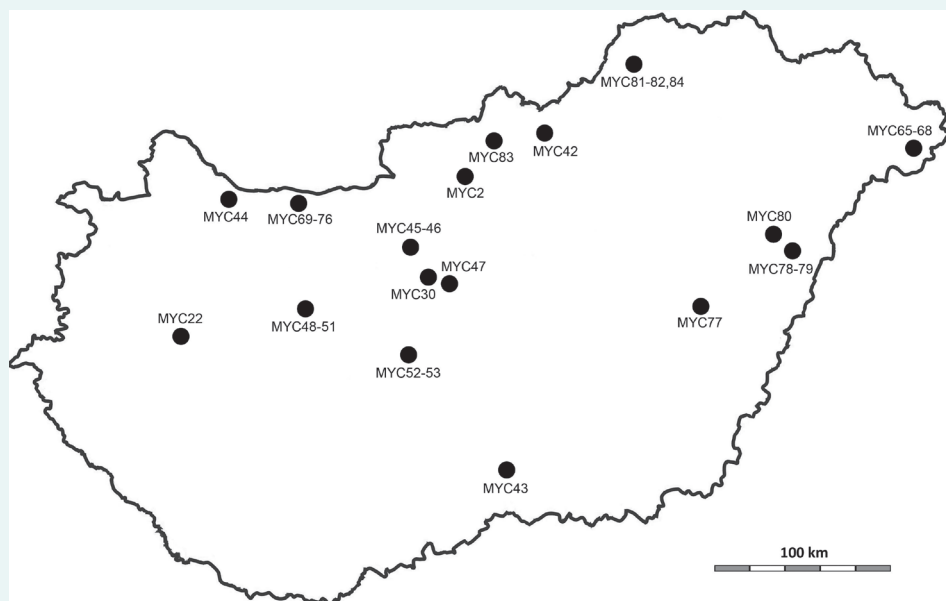
Vizsgálatunk célja 35 magyarországi izolátum antibiotikum-érzékenységi profiljának meghatározása volt 8 antibiotikum-csoport 15 antibiotikumával szemben, mikroleves-hígításos módszer segítségével.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Vizsgálatainkba az ország különböző területeiről 2010 és 2013 között gyűjtött kórbonctani és diagnosztikai minták feldolgozása során izolált 35 *M. bovis* törzset vontunk be (1. táblázat, 1. ábra). A szarvasmarhából gyűjtött orrtampont-, tüdő- és egy nyirokcsomómintát 2 ml *Mycoplasma* táplevesben (pH 7,8) homogenizáltuk (Thermo Fisher Scientific Inc./Oxoid Inc., Waltham, MA, USA), és 37 °C-on, 5% CO₂ mellett színváltozásig inkubáltuk. Szilárd *Mycoplasma* táptalajra szélesztve (Thermo Fisher Scientific Inc./Oxoid Inc., MA, USA) a látható telepek megjelenéséig tenyésztettük (37 °C, 5% CO₂), majd *Mycoplasma* agarról egy telepet levesbe oltva elszaporítottuk, s kis passzázsszámú színtenyészetet hoztunk létre. Az izolátumokat DNS-kivonást követően (QIAamp DNA Mini Kit /Qiagen Inc., Hilden, Németország/) a *M. bovis* *uvrC* génjére specifikus PCR (polymerase chain reaction) segítségével azonosítottuk (24). A törzsek tisztaságát (más *Mycoplasma*-fajok jelenlétét) egy, a *Mycoplasma*-*taceae* család 16S/23S spacer régiójára specifikus PCR-rendszerrel kapott termék bázissorrendjének a meghatározásával ellenőriztük (17). A PCR-termékek szekvenálását ABI Prism 3100 automata DNS-szekvenálóval (Applied Biosystems, Foster City, Kanada), a szekvenanciaanalízist BioEdit v7.2.5 programmal, az azonosítást BLAST kereső segítségével végeztük el. A törzsek rokonsági viszonyait korábban négy háztartási gén szekvenációja alapján térképeztük fel (25), amelyek szintén alátámasztották az izolátumok tisztaságát. A törzseket 1 ml-es egységekben, -70 °C-on tároltuk.

1. ÁBRA. A vizsgálatba bevont 35 hazai *M. bovis* törzs izolálási helye

FIGURE 1. Map of Hungary showing the geographical origins of the 35 *M. bovis* isolates tested



Vizsgálatainkba a következő antibiotikumokat vontuk be: fluorokinolonok (danofloxacin, enrofloxacin, marbofloxacin), aminoglikozid (gentamicin), aminociklotil (spektinomycin), tetraciklinek (oxitetraciklin, tetraciklin), makrolidok (tilozin, tilmikozin, tultatromicin, gamitromicin), fenikol (florfenikol), linkozamid (linkomicin) és pleuromutilinek (tiamulin, valnemulin). A tultatromicin a Pfizer Inc. (USA), míg a többi antibiotikum a Vetranal, Sigma-Aldrich Inc. (Németország) terméke volt. Az 1 mg/ml koncentrációjú törzsoladatokat a következő módon készítettük: az enrofloxacint, danofloxacint és marbofloxacint 0,1 M NaOH-oldatban, a gamitromicint, tultatromicint és florfenikolt 96% etanolban és steril desztillált vízben, a többi antibiotikumot pedig steril desztillált vízben oldottuk fel, és mindegyiket 1 ml-es egységekben, -70°C -on tároltuk felhasználásukig. A vizsgálathoz szükséges kettesalapú hígítási sorokat frissen készítettük a következő tartományokban: fluorokinolonok és pleuromutilinek 0,039–10 $\mu\text{g/ml}$, florfenikol 0,125–32 $\mu\text{g/ml}$, tetraciklinek, gentamicin és linkomicin 0,25–64 $\mu\text{g/ml}$, makrolidok 0,5–128 $\mu\text{g/ml}$ és spektinomycin 1–256 $\mu\text{g/ml}$.

Az antibiotikum-érzékenységet mikroleves-hígítási módszerrel vizsgálták

A mikroleves-hígítási vizsgálatok elvégzéshez 10^4 – 10^5 CCU/ml koncentrációjú baktériumszuszpenziót használtunk HANNAN (13) ajánlásai alapján. A lemez 1–9-es oszlopai tartalmazták az adott antibiotikum kettesalapú hígítási sorát, a 10. oszlop pedig sterilitási kontrollként szolgált (antibiotikum- és inokulummentes steril tápleves). A vizsgálati végpont meghatározáshoz a 11. oszlop pH 6,8-re beállított táplevesét használtuk. A 12. oszlop tartalmazta a növekedési kontrollt, mely az adott törzsből és antibiotikum-mentes Mycoplasma-levesből állt. Egy lemezen három klinikai izolátum és a referenciatörzs (*M. bovis* PG45, NCTC 10131) duplikátumban történő vizsgálatát végeztük el.

A MIC- (minimal inhibitory concentration, legkisebb gátló koncentráció) értéknek azt a legkisebb antibiotikum-koncentrációt adtuk meg, amelyik teljes mértékben gátolta a baktérium növekedését a táplevesben (nincs pH- és színváltozás) egy hét inkubációs idő letelte után (27). MIC_{50} - és MIC_{90} -értékeknek azt a legkisebb antibiotikum-koncentrációt adtuk meg, amely a törzsek 50, ill. 90%-át gátolta. A referenciatörzs (*M. bovis* PG45, NCTC 10131) kontrollként szolgált a vizsgálat során.

1. TÁBLÁZAT. A vizsgálatba bevont 35 hazai M. bovis izolátum és a referenciatörzs (M. bovis PG45, NCTC 10131) izolálási adatai és minimális gátló koncentráció értékei

TABLE 1. Background information and MIC data of the 35 Hungarian M. bovis isolates included in this study

Azonosító	Izolálás		Eredet	Fluorokinolon			Aminoglikozid	Aminociklotil
	helye	ideje		Danofloxacin	Enrofloxacin	Marbofloxacin	Gentamicin	Spektinomycin
PG45	Connecticut	1961	tüdő	0,156	0,156	0,625	4	4
MYC2	Püspökhatvan	2011	tüdő	0,156	0,156	0,625	2	2
MYC22	Sümeg	2012	tüdő	0,156	0,312	0,625	4	256
MYC30	Bugyi	2012	tüdő	0,156	0,156	0,625	4	256
MYC42	Nemti	2012	tüdő	0,156	0,156	0,625	8	4
MYC43	Zsana	2012	tüdő	0,156	0,156	0,312	4	256
MYC44	Győrszentiván	2012	tüdő	10	10	10	2	256
MYC45	Budapest	2012	tüdő	10	10	10	2	256
MYC46	Budapest	2012	tüdő	10	10	10	4	256
MYC47	Dabas	2012	tüdő	0,156	0,156	0,625	8	256
MYC48	Ósi	2012	orrtampon	0,156	0,156	0,625	8	256
MYC49	Ósi	2012	orrtampon	0,156	0,156	0,625	8	256
MYC50	Ósi	2012	tüdő	0,156	0,156	0,625	4	256
MYC51	Ósi	2012	orrtampon	0,156	0,08	0,312	4	256
MYC52	Solt	2012	tüdő	0,156	0,156	0,312	8	4
MYC53	Solt	2012	tüdő	0,156	0,156	0,625	16	4
MYC65	Csengersima	2012	orrtampon	0,156	0,156	0,625	2	2
MYC66	Csengersima	2012	orrtampon	0,156	0,156	0,625	8	4
MYC67	Csengersima	2012	tüdő	0,08	0,08	0,312	4	4
MYC68	Csengersima	2012	tüdő	0,156	0,156	0,625	4	4
MYC69	Komárom	2013	orrtampon	0,156	0,156	0,625	2	4
MYC70	Komárom	2013	orrtampon	0,156	0,156	0,625	4	2
MYC71	Komárom	2013	orrtampon	0,156	0,156	0,625	4	2
MYC72	Komárom	2013	orrtampon	0,156	0,156	0,625	4	4
MYC73	Komárom	2013	orrtampon	0,156	0,156	0,625	4	4
MYC74	Komárom	2013	orrtampon	0,156	0,156	0,625	4	4
MYC75	Komárom	2013	orrtampon	0,156	0,08	0,312	2	2
MYC76	Komárom	2013	orrtampon	0,156	0,156	0,625	4	4
MYC77	Kertészsziget	2010	tüdő	0,312	0,156	0,625	2	256
MYC78	Hosszúpályi	2011	tüdő	0,156	0,156	0,625	4	256
MYC79	Hosszúpályi	2011	tüdő	0,156	0,156	0,625	8	256
MYC80	Ebes	2011	nyirokcsomó	0,156	0,156	0,625	4	256
MYC81	Felsőnyárád	2013	tüdő	0,156	0,156	0,625	8	256
MYC82	Felsőnyárád	2013	orrtampon	0,156	0,156	0,625	4	256
MYC83	Alsótold	2013	tüdő	0,312	0,156	0,625	4	256
MYC84	Felsőnyárád	2013	orrtampon	0,156	0,156	0,625	4	256

MIC-érték (µg/ml)

Tetraciklin		Makrolid				Fenikol	Linkozamid	Pleuromutilin	
Oxitetraciklin	Tetraciklin	Gamitromicin	Tilmikozin	Tilozin	Tulatromicin	Florfenikol	Linkomicin	Tiamulin	Valnemulin
2	0,25	8	0,5	0,5	4	4	1	0,078	0,039>
16	4	16	128	16	16	4	1	0,156	0,039 >
64	16	128	128	128	128	8	64	0,312	0,039 >
32	8	16	128	128	128	4	64	0,156	0,039 >
64	8	16	128	32	16	8	1	0,156	0,039 >
64	16	16	128	128	128	8	64	0,312	0,039 >
64	8	128	128	128	128	8	64	0,312	0,039>
64	8	128	128	128	128	4	64	0,312	0,039>
64	8	128	128	128	128	8	64	0,625	0,039>
64	8	128	128	128	128	8	64	0,312	0,039>
64	16	128	128	128	128	4	64	0,312	0,039>
64	16	32	128	128	128	4	64	0,312	0,039 >
64	8	16	128	128	128	4	64	0,312	0,039 >
64	8	64	128	128	128	4	64	0,156	0,039 >
2	0,25	8	0,5	0,5	2	4	0,5	0,078	0,039 >
2	0,25	8	0,5	0,5	8	4	1	0,156	0,039 >
64	16	8	128	8	4	4	0,5	0,039	0,039 >
64	8	16	128	16	16	8	1	0,156	0,039 >
16	4	16	128	16	64	8	2	0,625	0,039 >
32	4	8	128	16	8	4	0,5	0,039	0,039 >
32	8	16	128	32	16	8	1	0,156	0,039 >
32	4	16	128	32	16	4	1	0,156	0,039 >
32	4	16	128	32	16	4	1	0,078	0,039 >
32	4	16	128	32	16	4	1	0,078	0,039 >
32	8	16	128	32	16	4	1	0,078	0,039 >
32	8	8	128	16	8	4	1	0,156	0,039 >
32	4	16	128	32	16	4	1	0,156	0,039 >
64	8	8	128	16	8	8	2	0,312	0,039 >
64	8	128	128	128	128	4	64	0,312	0,039 >
64	8	64	128	128	128	4	64	0,312	0,039 >
64	16	128	128	128	128	8	64	0,312	0,039 >
32	4	128	128	128	128	4	64	0,312	0,039 >
64	8	64	128	128	128	4	64	0,312	0,039 >
64	8	128	128	128	128	8	64	0,156	0,039 >
64	8	128	128	128	128	8	64	0,156	0,039 >
64	8	16	128	128	128	4	64	0,156	0,039 >

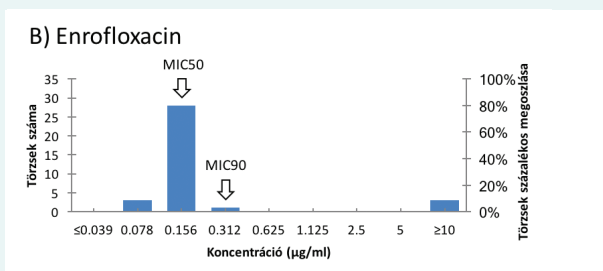
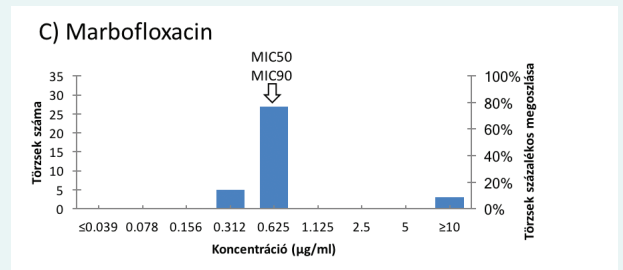
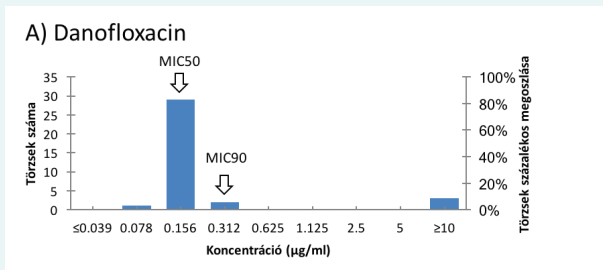
2. TÁBLÁZAT. A 35 magyarországi M. bovis törzs in vitro aktivitása a vizsgált antibiotikumokkal szemben

TABLE 2. Summary of range, mode, MIC₅₀ and MIC₉₀ values of the 35 M. bovis strains isolated from cattle in Hungary

		MIC-tartomány	Módusz	MIC ₅₀	MIC ₉₀
Fluorokinolon	Danofloxacin	0,078– ≥ 10	0,156	0,156	0,312
	Enrofloxacin	0,078– ≥ 10	0,156	0,156	0,312
	Marbofloxacin	0,312– ≥ 10	0,625	0,625	0,625
Aminoglikozid	Gentamicin	2–16	4	4	8
Aminociklotil	Spectinomycin	2– ≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256
Tetraciklin	Oxitetracliklin	2– ≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64
	Tetraciklin	≥ 0,25–16	8	8	16
Makrolid	Gamitromicin	8– ≥ 128	16	16	≥ 128
	Tilmikozin	≥ 0,5– ≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128
	Tilozin	≥ 0,5– ≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128
	Tulatromicin	2– ≥ 128	16	16	≥ 128
Fenikol	Florfenikol	4–8	4	4	8
Linkozamid	Linkomicin	0,5– ≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64
Pleuromutilin	Tiamulin	0,039– 0,625	0,156	0,156	0,312
	Valnemulin	≤ 0,039– ≤ 0,039	≤ 0,039	≤ 0,039	≤ 0,039

2. ÁBRA. M. bovis törzsek MIC-érték meghatározása mikroleves-hígítási módszerrel

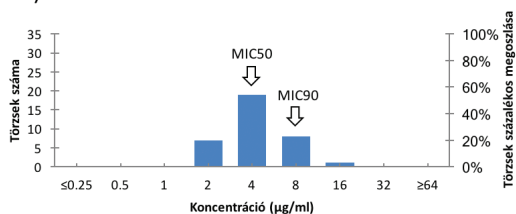
FIGURE 2. MIC determination of M. bovis strains by microbroth-dilution method



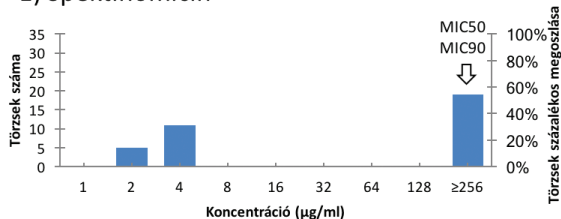
3. ÁBRA. A hazai M. bovis törzsek MIC-eredményei a 15 vizsgált antibiotikummal szemben
A nyilak a MIC₅₀ és MIC₉₀ értékeket jelölik

FIGURE 3. MIC distribution of the Hungarian M. bovis strains for each antibiotic tested in this study
Arrows indicate the MIC₅₀ and MIC₉₀ values

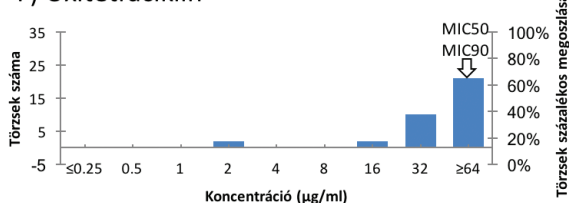
D) Gentamicin



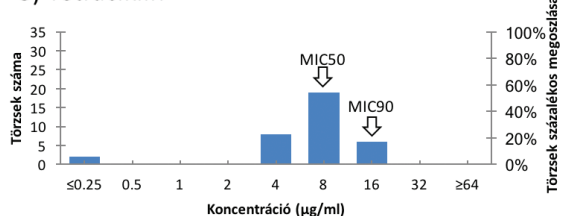
E) Spektinomycin



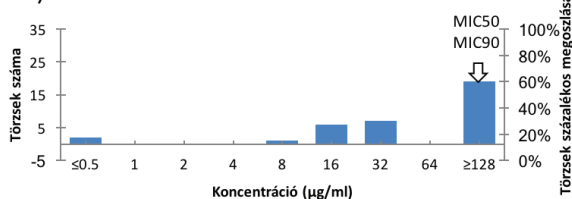
F) Oxitetraciklin



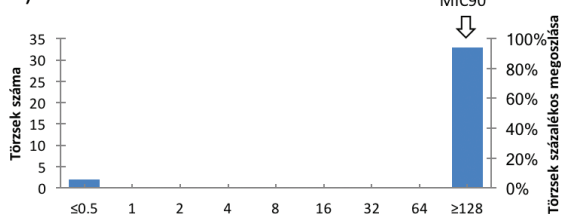
G) Tetraciklin



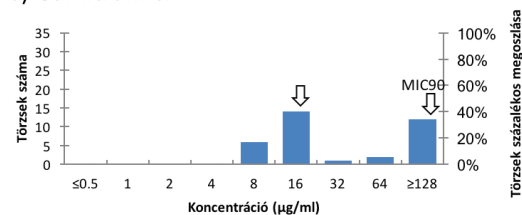
H) Tilozin



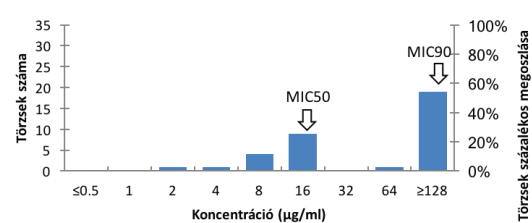
I) Tilmikozin



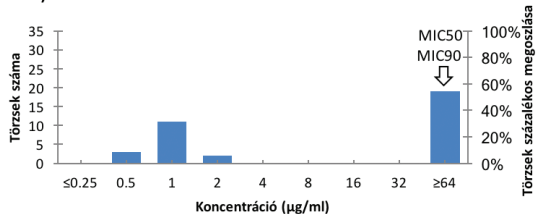
J) Gamitromicin



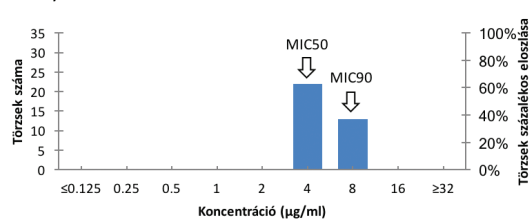
K) Tulatromicin



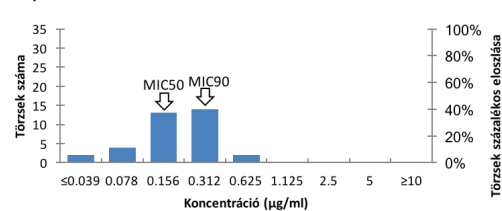
L) Linkomicin



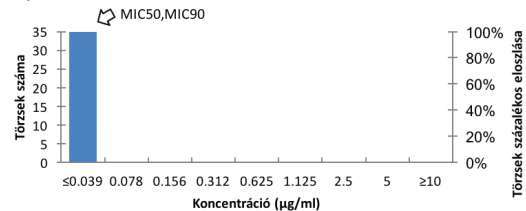
M) Florfenikol



N) Tiamulin



O) Valnemulin



EREDMÉNYEK

A referenciatörzs (*M. bovis* PG45, NCTC 10131) MIC-értékei változatlanok voltak a vizsgálat során, és megegyeztek a korábban leírt MIC-eredményekkel danofloxacin, enrofloxacin, marbofloxacin, oxitetraciklin, spektinomycin, tilmikozin és tilozin esetén (1. táblázat) (7, 13, 22, 27, 29), míg linkomicinnél és tiamulinnál kis mértékben nagyobb MIC-értékeket tapasztaltunk (7, 13, 27). Gentamicin, gamitromicin, tulatromicin, tetraciklin, florfenikol és valnemulin esetében nem állt rendelkezésre a referenciatörzsre vonatkozó mikroleves-hígításos módszerrel kapott összehasonlítható eredmény.

A pleuromutilinek kivételével, az összes antibiotikum esetén találtak nagy MIC-értékkel rendelkező törzset

A 35 hazai *M. bovis* törzs MIC-eredményei a 15 vizsgált antibiotikummal szemben az 1. és 2. táblázatban, valamint a 2. és 3. ábrán láthatóak. A pleuromutilinek kivételével, az összes antibiotikum esetén találtunk nagy MIC-értékkel rendelkező törzset. *In vitro* vizsgálataink alapján a fluorokinolonok és pleuromutilinek bizonyultak a leghatásosabb szernek. Az azonos helyről izolált törzsek hasonló antibiotikum-érzékenységi mintázatot mutattak (1. táblázat).

***In vitro* vizsgálataik alapján a fluorokinolonok és pleuromutilinek bizonyultak a leghatásosabb szernek**

A hazai törzsek szinte azonos antibiotikum-érzékenységi profilt mutattak mindhárom vizsgált fluorokinolonnal szemben (3. ábra, A–C). Három törzs (MYC44, MYC45 és MYC46) kiugróan nagy MIC-értékkel (≥ 10 $\mu\text{g/ml}$) rendelkezett danofloxaccinnal, enrofloxaccinnal és marbofloxaccinnal szemben, míg a törzsek többségének növekedését már 0,312, ill. 0,625 $\mu\text{g/ml}$ antibiotikum-koncentráció gátolta. A törzsek gentamicinre kapott MIC-értékei a MIC_{50} -érték (4 $\mu\text{g/ml}$) köré csoportosultak (3. ábra, D). Spektinomycin-érzékenység alapján a hazai törzsek két jól elkülöníthető csoportra váltak szét: az izolátumok 48%-a 4 $\mu\text{g/ml}$, vagy az alatti MIC-értékkel, míg a többi törzs legalább 256 $\mu\text{g/ml}$ MIC-értékkel rendelkezett (3. ábra, E). Két azonos szarvasmarha-állományból származó *M. bovis* izolátum (MYC52 és MYC53) esetén igen kis MIC-értékeket tapasztaltunk mind tetraciklinekkel, mind makrolidokkal szemben (3. ábra, F–I). A makrolidok közé tartozó tilmikozin esetén kapott MIC-értékek kétcsúcsú eloszlást mutattak: két törzs nagyon kicsi ($\leq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$), míg a többi törzs nagy (≥ 128 $\mu\text{g/ml}$) MIC-értékeket ért el. A tilozin esetén kapott MIC-értékek egyenletesebb eloszlást adtak. A vizsgált újabb generációs makrolidok (gamitromicin és tulatromicin) MIC-értékei nagyon hasonló, szintén kétcsúcsú eloszlást mutattak a MIC_{50} - (16 $\mu\text{g/ml}$) és MIC_{90} - (≥ 128 $\mu\text{g/ml}$) értékek között (3. ábra, H–K). A törzsek linkomicinre kapott MIC-értékei 2 $\mu\text{g/ml}$ alá, ill. 64 $\mu\text{g/ml}$ fölé csoportosultak (3. ábra, L), míg florfenikol esetén a MIC-értékek nem mutattak nagy változatosságot (4–8 $\mu\text{g/ml}$) (3. ábra, M). Az összes vizsgált hazai törzs nagyon kis MIC-értékeket adott tiamulinnal (MIC_{90} 0,312 $\mu\text{g/ml}$) és valnemulinál (MIC_{90} $\leq 0,039$ $\mu\text{g/ml}$) szemben (3. ábra, N–O).

MEGVITÁTÁS

GERCHMAN és mtsai (7) tizenegy, 2005 és 2007 között Magyarországról importált szarvasmarhából izolált *M. bovis* törzs antibiotikum-érzékenységét vizsgálták Izraelben. Munkájuk során – ugyan nagyobb MIC-értékekkel (MIC_{90} 1,25 $\mu\text{g/ml}$, 1,25 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ versus 0,312 $\mu\text{g/ml}$, 0,312 $\mu\text{g/ml}$, 0,625 $\mu\text{g/ml}$) – ugyancsak a fluorokinolonokat (danofloxacin, enrofloxacin, marbofloxacin) találták *in vitro* a leghatásosabb antibiotikumnak. Összhangban GERCHMAN és mtsai eredményeivel ($\text{MIC}_{90} > 1024$ $\mu\text{g/ml}$) (7) a hazai törzsek csökkent spektinomycin-érzékenységét tapasztaltuk vizsgálataink során ($\text{MIC}_{90} \geq 256$ $\mu\text{g/ml}$), ill. attól eltérően az általunk vizsgált törzsek csökkent antibiotikum-érzékenységét tapasztaltuk oxitetraciklinnel (≥ 64 $\mu\text{g/ml}$), tilmikozinnal (≥ 128 $\mu\text{g/ml}$) és tilozinnal (≥ 128 $\mu\text{g/ml}$) szemben. Ezen eredmények felhívják a figyelmet a *M. bovis* törzsek országon belüli rendszeres antibiotikum-érzékenység vizsgálatának fontosságára (7, 29).

A fluorokinolonok a hazai törzsek többségét kis MIC-értékekkel gátolták

A fluorokinolonok a hazai törzsek többségét (91,4%) kis MIC-értékekkel gátolták, alátámasztva a korábbi megfigyeléseket a fluorokinolonok *M. bovis* elleni hatékonyságáról (1, 5, 6, 7, 22, 23, 29). A marbofloxacin esetén kapott, danofloxacinnál és enrofloxacinnál enyhén nagyobb MIC-értékeket korábban már GERCHMAN és mtsai is leírták (7). Ez az érzékenységekülönbség valószínűsíthetőleg a marbofloxacin elmúlt években megnövekedett mértékű használatának a következménye (7). Kiemelkedően nagy MIC-értéket ($\geq 10 \mu\text{g/ml}$) kaptunk három törzs esetében (MYC44–46). Ezen törzsek hasonló rezisztenciaprofilja összhangban van korábbi MLST- (multi-locus sequence typing) vizsgálatunk eredményeivel, amely alapján ez a három törzs egy külön genetikai kládba csoportosult (25).

A hazai *M. bovis* törzsek többsége mérsékelten érzékeny volt gentamicinre

A hazai *M. bovis* törzsek többsége mérsékelten érzékeny volt gentamicinre (MIC_{90} 8 $\mu\text{g/ml}$). Hasonló, ill. kissé nagyobb értékeket írtak le Belgiumból, ill. Izraelelől származó izolátumoknál is (7, 28). Az aminociklotilok csoportjába tartozó spektinomycin gyakran használt antibiotikum a *M. bovis* okozta fertőzések kezelésére. Japánban hatásos szerként tartják számon (22, 27, 29), ezzel ellentétben a hazai törzsek nagyobb részénél nagy MIC-értékeket ($\geq 256 \mu\text{g/ml}$) tapasztaltunk, amely megfigyelést a korábbi, Európa-szerte végzett vizsgálatok is alátámasztják (1, 5, 6, 7, 28). Ezen eredmények a spektinomycin-rezisztencia terjedésére hívják fel a figyelmet.

A törzsek nagymértékű tetraciklin-rezisztenciát mutattak

A *M. bovis* törzsek változatos tetraciklin-érzékenységi mintázatát írták le szerte a világon (1, 6, 7, 22, 28, 29). A magyarországi izolátumok közül csupán két törzs adott kis MIC-értéket tetraciklinnel és oxitetra-ciklinnel szemben, ami a törzsek nagymértékű tetraciklin-rezisztenciájára utal. Növekvő mértékű oxitetra-ciklin-rezisztenciát figyeltek meg brit, belga, japán és francia izolátumok vizsgálata során is (1, 6, 28, 29).

A makrolidok esetében csökkenő hatékonyságot tapasztaltak

Korábbi vizsgálatokkal összhangban nagy MIC-értékeket tapasztaltunk a vizsgált makrolidoknál ($\text{MIC}_{90} \geq 128 \mu\text{g/ml}$) a hazai izolátumok esetén, ami a makrolidok csökkenő hatékonyságára hívják fel a figyelmet (1, 6, 7, 22, 29). Az általunk vizsgált törzsek tilmikozinnal szembeni MIC-értékei két különálló csoportot alkottak, a tilozin MIC-értékei egyenletes megoszlást mutattak, míg a vizsgált újabb generációs makrolidok (gamitromicin és tultatromicin) MIC-értékeinek U alakú eloszlása szinte teljesen megegyezett (3. ábra, H-K). A tilmikozinhoz képest, a tilozin-rezisztencia lassabb fejlődése okozhatja az általunk tapasztalt kisebb MIC-értékeket (31), amit korábban is megfigyeltek *M. bovis*, ill. *M. gal-lisepticum* törzsek esetén (7, 15). Más európai *M. bovis* törzsek gamitromicin- és tultatromicin-érzékenység vizsgálatához hasonlóan a hazai törzsek is nagy MIC_{90} -értékekkel rendelkeztek, viszont a magyarországi törzsek MIC_{50} -értékei nagyobbak adódtak (2, 6, 8, 14). GODINHO és mtsai a MIC_{50} -értékek (0,25–4 $\mu\text{g/ml}$) emelkedését írták le az újabb izolátumok esetén, változatlanul nagy MIC_{90} -értékek (> 64 $\mu\text{g/ml}$) mellett (8).

A makrolidok klinikai hatékonysága eltérő képet mutat. Egy korai esettanulmány a tilmikozin hatékony klinikai alkalmazását mutatta be (10), míg 12 évvel később a tilmikozin *in vivo* hatástalannak bizonyult *M. bovis* fertőzés kezelése során (11). Ezen eredmények a túlzott antibiotikum-felhasználás következtében kialakult rezisztencia terjedésére utalnak. Tultatromicinre 64 $\mu\text{g/ml}$ feletti MIC-értéket mutató *M. bovis* törzsszel fertőzött borjakat eredményesen kezelték tultatromicinnel. A tanulmány szerzői arra következtettek, hogy a nagy tultatromicin MIC-értéknek nem feltétlenül következménye a klinikai hatástalanság (9), amit a tultatromicin nagymértékű tüdőbeli felhalmozódása és lassú kiürülése okozhat (3).

Kiugróan kis MIC-értékeket tapasztaltunk tetraciklinekkel és makrolidokkal szemben két, azonos tenyészetből származó izolátum (MYC52 és MYC53), valamint a PG45 referenciatörzs esetében. Ez a három törzs külön csoportot alkotott a korábbi genetikai (MLST) analízis során is (25).

Az összes hazai izolátum nagy MIC-értéket mutatott florfenikollal szemben (MIC_{90} 8 $\mu\text{g/ml}$), amelyhez hasonló eredményeket kaptak korábban az Egyesült Királyságban (16 $\mu\text{g/ml}$), az Egyesült Államokban (4 $\mu\text{g/ml}$) és Franciaországban (16 $\mu\text{g/ml}$) végzett *in vitro* vizsgálatok során is (1, 6, 22).

A linkomicinnel szemben kapott MIC_{90} - (\geq 64 $\mu\text{g/ml}$) érték nagyobb volt korábban holland, belga és japán izolátumok vizsgálata során kapott MIC_{90} - (1 $\mu\text{g/ml}$, 8 $\mu\text{g/ml}$, 64 $\mu\text{g/ml}$) értékekhez képest (27, 28, 29). A hazai törzsek több mint fele nagy MIC-értékkel rendelkezett a linkozamidok ezen tagjával szemben.

A pleuromutilinek az állatgyógyászatban használt, elsősorban sertések és baromfi légzőszervi megbetegedéseinek kezelésére használt antibiotikumok (30). A *M. bovis* törzsek tiamulin- és valnemulin-érzékenységevel foglalkozó kevés tanulmány – eredményeinket alátámasztva – kis MIC-értékekről számolt be (6, 28).

Az *in vitro* antibiotikum-érzékenységi vizsgálatok csak jósolhatják az adott antibiotikum *in vivo* hatékonyságát, a gyógykezelés eredményességéről azonban nem szolgáltatnak információt. Jelenleg nem állnak rendelkezésre a klinikum számára is értelmezhető kategóriák (érzékeny, mérsékelten érzékeny, rezisztens) elkülönítésére alkalmas határértékek *M. bovis* esetében. Számos szerző az egyes antibiotikumok más szarvasmarha-kórokozóra, néhány esetben más gazdafajra vonatkoztatott határértékeit vette át az eredmények értelmezéséhez (5, 6, 7, 22, 23, 29). Mindezen megjegyzéseket figyelembe véve *in vitro* vizsgálataink alapján valószínűleg a fluorokinolonok és a pleuromutilinek lehetnek a leghatékonyabb antibiotikumok *in vivo* a Magyarországon előforduló *M. bovis* izolátumokkal szemben.

Munkánk során 35 szarvasmarhából izolált hazai *M. bovis* törzs antibiotikum-érzékenységi profilját határoztuk meg 15 antibiotikummal szemben. Eredményeink felhívják a figyelmet a rendszeres antibiotikum-érzékenységi vizsgálat fontosságára, ill. a gyakorlatban a *M. bovis* fertőzések kezelésére gyakran használt antibiotikumok (elsősorban tetraciklinek és makrolidok) ellen kialakult rezisztencia széles körű előfordulására. *In vitro* vizsgálataink alapján a fluorokinolonok és a pleuromutilinek bizonyultak a legígéretesebb antimikrobiális szerekeknek a *M. bovis* okozta hazai fertőzések kezelésére. A három, magyarországi fluorokinolon-rezisztens *M. bovis* törzs megjelelése azonban felhívja a figyelmet a felelősségteljes antibiotikum-használat fontosságára is, amelyet az Európai Unió ezen antibiotikum-csoport esetén különösen hangsúlyoz (4). A fluorokinolonok használata csak előzetes antibiotikum-érzékenységi vizsgálat elvégzése után, súlyos fertőzések esetén ajánlott csak, amikor más antibiotikum-terápia már eredménytelen.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A vizsgálatok anyagi forrását a Magyar Tudományos Akadémia Lendület pályázata (LP2012-22) biztosította. Az eredmények többségének első közlése a *BMC Veterinary Research* c. folyóirat 2014. évi 10. kötetében jelent meg: SÜLYOK, K. M. – KREIZINGER, Z. – FEKETE, L. – HRIVNÁK, V. – MAGYAR, T. – JÁNOSI, S. – GYURANECZ, M.: Antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma bovis* strains isolated from cattle in Hungary, Central Europe. *BMC Veterinary Research*, 2014. 10. 1.

Az *in vitro* antibiotikum-érzékenységi vizsgálatok csak jósolhatják az adott antibiotikum *in vivo* hatékonyságát, a gyógykezelés eredményességéről azonban nem szolgáltatnak információt

IRODALOM

1. AYLING, R. D. – BAKER, S. E. et al.: Comparison of *in vitro* activity of danofloxacin, florfenicol, oxytetracycline, spectinomycin and tilmicosin against recent field isolates of *Mycoplasma bovis*. *Vet. Rec.*, 2000. 146. 745–747.
2. AYLING, R. D. – ROSALES, R. S. et al.: Changes in antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolates from Great Britain. *Vet. Rec.*, 2014. 175. 486.
3. BENCHAOUI, H. A. – NOWAKOWSKI, M. et al.: Pharmacokinetics and lung tissue concentrations of tulathromycin in swine. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 2004. 27. 203–210.
4. EUROPEAN MEDICINES AGENCY, EMA/186029/2010. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/veterinary/referrals/Quinolones_containing_medicinal_products/vet_referral_000039.jsp&mid=WC0b01ac05800986a1
5. FRANCOZ, D. – FORTIN, M. et al.: Determination of *Mycoplasma bovis* susceptibilities against six antimicrobial agents using the E test method. *Vet. Microbiol.*, 2005. 105. 57–64.
6. GAUTIER-BOUCHARDON, A. V. – FERRÉ, S. et al.: Overall decrease in the susceptibility of *Mycoplasma bovis* to antimicrobials over the past 30 years in France. *PLoS ONE*, 2014. 9.
7. GERCHMAN, I. – LEVISOHN, et al. imported cattle. *Vet. Microbiol.*, 2009. 137. 268–275.
8. GODINHO, K. S.: Susceptibility testing of tulathromycin: Interpretative breakpoints and susceptibility of field isolates. *Vet. Microbiol.*, 2008. 129. 426–432.
9. GODINHO, K. S. – RAE, A. et al.: Efficacy of tulathromycin in the treatment of bovine respiratory disease associated with induced *Mycoplasma bovis* infections in young dairy calves. *Vet. Ther.*, 2005. 6. 96–112.
10. GOURLAY, R. N. – THOMAS, L. H. et al.: Effect of a new macrolide antibiotic (tilmicosin) on pneumonia experimentally induced in calves by *Mycoplasma bovis* and *Pasteurella haemolytica*. *Res. Vet. Sci.*, 1989. 47. 84–89.
11. HAINES, D. M. – MARTIN, K. M. et al.: The immunohistochemical detection of *Mycoplasma bovis* and bovine viral diarrhoea virus in tissues of feedlot cattle with chronic, unresponsive respiratory disease and/or arthritis. *Can. Vet. J.*, 2001. 42. 857–860.
12. HALE, H. H. – HELMBOLDT, C. F. et al.: Bovine mastitis caused by a *Mycoplasma* species. *Cornell Vet.*, 1962. 52. 582–591.
13. HANNAN, P. C. T.: Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. *Vet. Res.*, 2000. 31. 373–395.
14. HEUVELINK, A. – REUGEBRINK, C. – MARS, J.: Antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolates from veal calves and dairy cattle in the Netherlands. *Vet. Microbiol.*, 2016. 189. 1–7.
15. JORDAN, F. T. – HORROCKS, B. K.: The minimum inhibitory concentration of tilimicosin and tylosin for *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* and a comparison of their efficacy in the control of *Mycoplasma gallisepticum* infection in broiler chicks. *Avian Dis.*, 1996. 40. 326–334.
16. KROEMER, S. – GALLAND, D. et al.: Survey of marbofloxacin susceptibility of bacteria isolated from cattle with respiratory disease and mastitis in Europe. *Vet. Rec.*, 2012. 170. 53.
17. LAUERMAN, L. H. – CHILINA, A. R., et al.: Avian mycoplasma identification using polymerase chain reaction amplicon and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Dis.*, 1995. 39. 804–811.
18. LYSNYANSKY, I. – AYLING, R. D.: *Mycoplasma bovis*: Mechanisms of resistance and trends in antimicrobial susceptibility. *Front. Microbiol.*, 2016. 7. 1–7.
19. MAUNSELL, F. P. – WOOLUMS, A.R. et al.: *Mycoplasma bovis* infections in cattle. *J. Vet. Intern. Med.*, 2011. 25. 772–783.
20. NICHOLAS, R. A. J. – AYLING, R. D.: *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control. *J. Vet. Intern. Med.*, 2003. 74. 105–112.
21. NICHOLAS, R. A. J. – WOOD, E. et al.: *Mycoplasmas* isolated from ruminants in Britain 1995–2000. In: POVEDA J. B. – FERNANDEZ A, et al. (eds.): *Mycoplasmas of Ruminants: Pathogenicity, Diagnostics, Epidemiology and Molecular Genetics*, 2001. 5. 116–120.
22. ROSENBUSCH, R. F. – KINYON, J. M. et al.: *In vitro* antimicrobial inhibition profiles of *Mycoplasma bovis* isolates recovered from various regions of the United States from 2002 to 2003. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2005. 17. 436–441.
23. SOEHNLEN, M. K. – KUNZE, M. E. et al.: *In vitro* antimicrobial inhibition of *Mycoplasma bovis* isolates submitted to the Pennsylvania Animal Diagnostic Laboratory using flow cytometry and a broth microdilution method. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2011. 23. 547–51.
24. SUBRAMANIAM, S. – BERGONIER, D. et al.: Species identification of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* based on the *uvrC* genes by PCR. *Mol. Cell. Probes*, 1998. 12. 161–169.
25. SULYOK, K. M. – KREIZINGER, Z. et al.: Phylogeny of *Mycoplasma bovis* isolates from Hungary based on multi locus sequence typing and multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *BMC Vet. Res.*, 2014. 10. 108.
26. TENK, M. – STIPKOVITS, L. – HUFNAGEL, L.: Examination of the role of *Mycoplasma bovis* in bovine pneumonia and a mathematical model for its evaluation. *Acta Vet. Hung.*, 2004. 52. 445–456.
27. TER LAEK, E. A. – NOORDERGRAAF, J. H. – VERSCHURE, M. H.: Susceptibilities of *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma dispar*, and *Ureaplasma diversum* strains to antimicrobial agents *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1993. 37. 317–321.
28. THOMAS, A. – NICOLAS, C. D. et al.: Antibiotic susceptibilities of recent isolates of *Mycoplasma bovis* in Belgium. *Vet. Rec.*, 2003. 153. 428–431.
29. UEMURA, R. – SUEYOSHI, M. – NAGATOMO, H.: Antimicrobial susceptibilities of four species of *Mycoplasma* isolated in 2008 and 2009 from cattle in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 2010. 72. 1661–1663.
30. VAN DUJIKEREN, E. – GREKO, C. et al.: Pleuromutilins: Use in food-producing animals in the European Union, development of resistance and impact on human and animal health. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2014. 69. 2022–2031.
31. WU, C. M. – WU, H. et al.: Induction of macrolide resistance in *Mycoplasma gallisepticum in vitro* and its resistance-related mutations within domain V of 23S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2005. 247. 199–205.

Közlésre érkező: 2016. szeptember 7.